

## Área: Engenharia de Alimentos

# CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM SUSPENSÃO USANDO DIFERENTES SANITIZANTES COMO AGENTE ATIVO

**Cezar Augusto Beltrame, Ieda Rottava, Lindomar Alberto Lerin, Gabriela Busnello  
Kubiak, Marcela Geisa Becegatto, Rogério Luis Cansian, Geciane Toniazzi, Jamile  
Zeni, Jonaina Gomes\***

*Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências  
Agrárias, URI-Campus de Erechim*

*\*E-mail: jonainaerechim@hotmail.com*

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão, usando clorexidina e ácido peracético como agentes ativos, determinando os respectivos valores D, permitindo calcular o valor Z e os diferentes valores F. Para a obtenção do valor D, foi realizada a regressão linear entre os diferentes tempos de exposição do micro-organismo ao desinfetante e o log de UFC sobreviventes, sendo D o inverso do coeficiente angular da reta ajustada. A constante Z representa a alteração de concentração necessária para que ocorra uma alteração de um ciclo logarítmico no tempo de morte ocasionado pelo desinfetante. Para a obtenção do valor Z, realizou-se a regressão linear entre as diferentes concentrações do desinfetante (C) e o log do respectivo valor D, sendo Z obtido a partir do inverso do coeficiente angular da reta ajustada. A regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina (0,2%, 0,1% e 0,05%), ácido peracético (0,2%, 0,15% e 0,05%), permitiu determinar os valores D nestas concentrações obtendo-se 1,38, 3,087 e 4,81 minutos, respectivamente, para a clorexidina, 1,18, 4,05 e 21,74 minutos, respectivamente, para o ácido peracético, fornecendo valores de Z de -0,2788 e -0,12108 respectivamente. Os Valores de F dos sanitizantes avaliados mostram que a redução de concentração afeta drasticamente o tempo necessário de exposição quando se utiliza ácido peracético.

**Palavras-chave:** Inativação, *Listeria monocytogenes*, sanitizantes, ácido peracético, clorexidina.

## 1 INTRODUÇÃO

A higienização na indústria de alimentos está inserida no contexto das Boas Práticas de Fabricação (BPFs) e dos programas de qualidade como o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Assim, seu objetivo final é a obtenção de alimentos seguros, particularmente sob os aspectos associados às contaminações com agentes químicos, físicos e microbiológicos, além de contribuir para a manutenção das características sensoriais e nutritivas desses alimentos, sendo importante também para o controle da contaminação cruzada durante a produção (Morreli, 2008).

A indústria de alimentos deve propor limites de segurança que deverão ter um sistema de monitoramento, de medição e de registro com frequência definida para assegurar que o procedimento será efetivo e o que foi estabelecido será alcançado. Dentro dos limites estabelecidos, pode-se considerar que os perigos químicos, físicos e ou microbiológicos serão controlados. Dentre desses controles estão incluídos, por exemplo, as concentrações dos princípios ativos das soluções sanitizantes;

Deve-se selecionar sanitizantes que sejam aprovados pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura; apresentem amplo espectro de ação antimicrobiana e capazes de destruir rapidamente os micro-organismos; e sejam estáveis sob variadas condições de uso e que possuam baixa toxicidade e corrosividade (Andrade et al., 2008).

O ácido peracético, também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético é obtido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com o peróxido de hidrogênio. É um excelente sanitizante pela grande capacidade de oxidação dos componentes celulares dos micro-organismos, tendo uma rápida ação a baixas concentrações (0,0001% a 0,2%) sobre um amplo espectro de micro-organismos. É esporicida em baixas temperaturas e continua efetivo na presença de material orgânico sendo, portanto, um biocida efetivo sem residual tóxico. Sua ação biocida é influenciada pela concentração, temperatura e tipo de micro-organismos (Nascimento, 2002). O ácido peracético atua diretamente nas bases da molécula de DNA que são capazes de inativar a catalase, de uma enzima que pode interferir nos radicais hidroxil, podendo ocorrer uma desnaturação de proteínas e enzimas dos micro-organismos (Block, 1991).

A clorexidina é uma substância química que foi introduzida há muitos anos como anti-séptico de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e negativas (Davies et al., 1954). É uma biguandina com propriedades catiônicas. Quimicamente é classificada como Digluconato de Clorexidina, molécula estável que quando ingerida é excretada pelas vias normais, sendo que a pequena porcentagem retida no organismo não é tóxica. Quando em baixas concentrações, provoca lixiviação de substâncias de pequeno peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo efeito bacteriostático e bactericida em altas concentrações (Denton, 1991). O mecanismo de ação da clorexidina se caracteriza pela rápida absorção pelas células bacterianas, resultando em diversas modificações citológicas que afetam a permeabilidade e propriedades óticas. A quantidade do agente químico absorvida é proporcional a sua concentração, à densidade da célula bacteriana e à composição e pH do meio. Pesquisas revelam que a clorexidina reage com a célula a partir de grupamentos lipofóbicos, provocando uma desorientação de membrana lipoproteica, o que leva a uma alteração em sua função de barreira osmótica (Andrade & Macedo, 1996).

*Listeria monocytogenes* tem sido considerado o mais importante patógeno transmitido por alimentos devido à alta taxa de morte em grupos de risco (Thévenot et al., 2005), e pela sua capacidade de sobreviver em condições adversas (Varabioff, 1992; Incze, 1998; Bolton & Frank, 1999; Bonnet & Monteville, 2005).

As empresas fornecedoras de sanitizantes os indicam para qualquer problema, pois quase todos afirmam que a eficiência do produto é grande para vários micro-organismos. Desta forma, a escolha de um sanitizante adequado é muito importante para o alcance de um resultado final satisfatório nos índices microbiológicos, mas para isso é necessário um conhecimento do tipo de problema que se quer tratar e também da eficiência do sanitizante frente ao meio utilizado e aos micro-organismos presentes. Com baseno exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão, usando clorexidina e ácido peracético como agentes ativos, determinando os respectivos valores D, permitindo calcular o valor Z e os diferentes valores F.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1.1 Cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão

Foram avaliadas as curvas cinéticas de letalidade de *Listeria monocytogenes* em diferentes tempos e concentrações de sanitizantes (clorexidina e ácido peracético) determinando os respectivos valores D, permitindo calcular o valor Z e os diferentes valores F.

A linhagem de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) mantida em meio Luria Bentani (triptona 10,0 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L, NaCl 5,0 g/L) a 4°C foi subcultivada para preparação do inóculo em caldo padrão de contagem (triptona 5,0 g/L, extrato de levedura 2,5 g/L, e dextrose 1,0 g/L) a 35°C por 24 horas.

A partir deste inóculo foram preparadas diluições em água destilada ( $10^0$  a  $10^{-8}$ ) e em cada réplica de diluição foi adicionada uma diferente concentração do desinfetante clorexidina (2,0, 1,0 e 0,5 mL/L) e ácido peracético (2,0, 1,5 e 0,5 mL/L), mantidos a 25°C. Estas diluições foram inoculadas em meio agar padrão de contagem (agar 10 g/L, triptona 5 g/L, extrato de levedura 2,5 g/L, e dextrose 1,0 g/L) após diferentes tempos de exposição ao desinfetante (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 12,5; 15; 18 e 20 minutos) e incubados a 35°C por 24 horas. Diluições sem o desinfetante também foram inoculadas em Agar padrão de contagem e incubadas a 35°C por 24 horas para determinar o número inicial de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

As contagens foram realizadas nas placas oriundas das diluições com um número inferior a 350 colônias em cada um dos tempos de exposição ao desinfetante. Todas as determinações foram feitas em duplicata e os resultados expressos como valor médio.

O modelo matemático para determinar o tempo de redução decimal (valor-D) de *L. monocytogenes* em uma determinada concentração do desinfetante foi baseado em um balanço diferencial de primeira ordem (baseado em similaridades com processos de tratamento térmico):

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (1)$$

Onde N é o número de UCF, t é tempo de processo, k é a constante de proporcionalidade.

Integrando-se a Equação (1) com a seguinte condição inicial N (t=0) = N<sub>0</sub>, onde N<sub>0</sub> é o número de UCF inicial, tem-se;

$$\ln N - \ln N_0 = -kt \quad (2)$$

Rearranjando a Equação (2) em termos de log tem-se;

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{1}{D}t \quad (3)$$

onde, k = 1/D e D definido como a constante de redução decimal, a qual representa o tempo necessário para haver a ocorrência de 1 (um) ciclo log no processo.

Para a obtenção do valor D, foi realizada a regressão linear entre os diferentes tempos de exposição do micro-organismo ao desinfetante e o log de UFC sobreviventes, sendo D o inverso do coeficiente angular da reta ajustada.

A constante de resistência de morte de *L. monocytogenes* ao desinfetante (valor-Z) foi determinada pela seguinte equação:

$$\log\left(\frac{D_1}{D_2}\right) = \frac{1}{Z}(C_1 - C_2) \quad (4)$$

Onde D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> são valores de redução decimal obtidos para as concentrações C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, respectivamente. A constante Z representa a alteração de concentração necessária para que ocorra uma alteração de um ciclo log (90% de redução) no tempo de morte ocasionado pelo desinfetante.

Para a obtenção do valor Z, foi realizada a regressão linear entre as diferentes concentrações do desinfetante (C) e o log do respectivo valor D, sendo Z obtido a partir do inverso do coeficiente angular da reta ajustada.

É interessante salientar que a Equação (4) é de fundamental importância e utilidade em projetos, simulações e aplicações industriais do produto em foco neste trabalho. A partir do conhecimento da constante Z e dos valores de D1 em uma concentração C1 pode-se determinar o valor da concentração de aplicação do produto.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 Cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão usando diferentes sanitizantes como agente ativo

#### 2.2.1.1 Clorexidina

A regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina a 0,2%, 0,1% 0,05%, permitiu determinar os valores D nestas concentrações obtendo-se 1,38, 3,09 e 4,81 minutos, respectivamente.

Mazzola et al. (2003) realizaram a determinação do tempo de redução decimal (valor-D) com clorexidina em diferentes bactérias. As cepas vegetativas que mostraram a maior resistência à solução de 0,4% clorexidina foram *Enterococcus cloacae* (D=8,3 min) e *Staphylococcus aureus* (D=5,9 min). As mais sensíveis foram *A. calcoaceticus* (D=4,1 min), *Serratia marcescens* (D=4,0 min) e *Escherichia coli* (D=3,0 min). Um intervalo de tempo de 3 a 4 minutos foi o bastante para reduzir 90% da população de *E. coli*, *S. marcescens* e *A. calcoaceticus*; uma redução de 3 log<sub>10</sub> para estas espécies variou entre 9 a 12 minutos. Esporos expostos a 2% de clorexidina mostraram valores D próximos entre si com D=9,1 min para *Bacillus stearothermophilus* e D=6,7 min para *Bacillus subtilis*.

A regressão linear entre o Log dos valores D de *L. monocytogenes* em relação às concentrações de clorexidina testadas, mostrou alta linearidade entre os diferentes valores D obtidos e forneceu um valor Z de -0,27882. Usando-se o valor Z calculado, foi possível determinar diferentes valores de D em diferentes concentrações de uso. Plotando-se os valores de D calculados e valores de D experimentais, obteve-se uma alta correlação linear (R<sup>2</sup> =

0,9999) e um valor calculado de -0,27866, semelhante ao valor Z determinado pela regressão entre os valores D e concentrações experimentais (-0,27882).

Assim, com contagens hipotéticas iniciais de 1000, 100 e 10 UFC/cm<sup>2</sup> resultam em tempos exigidos de contato de 8,28, 6,9 e 5,52 minutos de clorexidina a 0,2% (valor D=1,38 min). Já utilizando-se a concentração de 0,05% (valor D=12,35 min) e as mesmas contagens hipotéticas, os tempos necessários de contato são 28,86; 24,05 e 19,24 minutos, respectivamente. Nas mesmas condições, com uma concentração de 0,1% de clorexidina (valor D=3,09 min), tempos intermediários são necessários (18,52; 15,43 e 12,35 minutos).

#### 2.2.1.2 Ácido peracético

A regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com ácido peracético a 0,2%, 0,15% e 0,05%, permitiu determinar os valores D nestas concentrações obtendo-se 1,18, 4,05 e 21,74 minutos, respectivamente. A regressão linear entre o Log dos valores D de *L. monocytogenes* em relação às concentrações de ácido peracético testadas, mostrou alta linearidade entre os diferentes valores D obtidos e forneceu um valor Z de -0,12108.

Usando-se o valor Z calculado, foi possível determinar diferentes valores de D em diferentes concentrações de uso. Plotando-se os valores de D calculados e valores de D experimentais, obteve-se uma alta correlação linear ( $R^2 = 0,9973$ ) e um valor calculado de -0,12112, semelhante ao valor Z determinado pela regressão entre os valores D e concentrações experimentais (-0,12108).

Assim, com contagens hipotéticas iniciais de 1000, 100 e 10 UFC/cm<sup>2</sup> resultam em tempos exigidos de contato de 7,08, 5,9 e 4,72 minutos de ácido peracético a 0,2% (valor D=1,18 min). Já utilizando-se a concentração de 0,05% (valor D=21,74 min) e as mesmas contagens hipotéticas, os tempos necessários de contato são 130,44, 108,70 e 86,96 minutos, respectivamente. Nas mesmas condições, com uma concentração de 0,15% de ácido peracético (valor D=4,05 min), tempos intermediários são necessários (24,3, 20,25 e 16,20 minutos).

#### 2.2.1.3 Comparação entre os diferentes sanitizantes

Considerando a aplicação destes resultados em uma planta industrial com diferentes níveis de contaminação inicial e uma contagem de  $10^{-3}$  UFC/cm<sup>2</sup> para uma desinfecção

eficiente (Stumbo, 1948a,b; Abraham et al., 1990) pode-se calcular o tempo necessário de contato do sanitizante.

A Tabela 1 apresenta os valores de D, Z e F para reduzir a carga de *Listeria monocytogenes* a  $1 \times 10^{-3}$  UFC/cm<sup>2</sup>, usando clorexidina e ácido peracético, em diferentes concentrações e contagens iniciais. Observa-se que a redução na concentração de clorexidina de 0,2% para 0,05% provoca um aumento de 3,48 vezes no tempo de exposição necessário para reduzir a carga de *Listeria monocytogenes* a  $1,0 \times 10^{-3}$  UFC/cm<sup>2</sup>. Com ácido peracético a mesma redução de concentração (0,2 para 0,05%) resulta em um aumento de 18,42 vezes neste tempo. Como já esperado, ao analisar os valores F com contagens iniciais de  $1,0 \times 10^3$  para  $1,0 \times 10^1$ , verifica-se uma redução de 1,5 vezes no tempo de exposição, independentemente do sanitizante e concentração empregados.

Embora alguns autores tenham reportado um comportamento não linear da taxa de morte de determinados micro-organismos frente a diferentes desinfetantes (Campbell & Dimmick, 1966; Turners, 1983; Sutton et al., 1991), os resultados do presente estudo indicam um comportamento linear do tempo de redução decimal de *L. monocytogenes* frente à clorexidina.

Tabela 1 - Valores D, Z e F para reduzir a carga de *Listeria monocytogenes* a  $1 \times 10^{-3}$  UFC/cm<sup>2</sup>, usando clorexidina e ácido peracético, em diferentes concentrações e contagens iniciais.

Sanitizante	Concentração (%)	Valor D (min)	Valor F (min)		
			Contagem inicial (UFC/cm <sup>2</sup> )		
			$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$
Clorexidina (Valor Z = - 0,279)	0,2	1,38	8,28	6,90	5,52
	0,1	3,09	18,52	15,43	12,35
	0,05	12,35	28,86	24,05	19,24
Ácido Peracético (Valor Z = - 0,121)	0,2	1,18	7,08	5,90	4,72
	0,15	4,05	24,30	20,25	16,20
	0,05	21,74	130,44	108,70	86,96

Estes resultados são de grande utilidade na tomada de decisão quanto ao procedimento de higienização de uma planta industrial, pois permite a escolha da melhor relação concentração de produto/tempo de exposição, visando a redução de custos sem perda de eficiência do sanitizante.



### 3 CONCLUSÃO

A regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina (0,2%, 0,1% e 0,05%), ácido peracético (0,2%, 0,15% e 0,05%), permitiu determinar os valores D nestas concentrações obtendo-se 1,38, 3,087 e 4,81 minutos, respectivamente, para a clorexidina, 1,18, 4,05 e 21,74 minutos, respectivamente, para o ácido peracético, fornecendo valores de Z de -0,2788 e -0,12108 respectivamente. Os Valores de F dos sanitizantes avaliados mostram que a redução de concentração afeta drasticamente o tempo necessário de exposição quando se utiliza ácido peracético. Os resultados relacionados a inativação de *L. monocytogenes* indicam um comportamento linear do tempo de redução decimal deste micro-organismo frente os sanitizantes avaliados.

### REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, G.; DEBRAY, E.; CANDAU, Y. & PIAR, G. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 3073-3080, 1990.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N.J. (Ed). *Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: Varela, 2008, p.185-221.
- ANDRADE, N. J. & MACEDO, J. A. B. *Higienização na Indústria de Alimentos*, São Paulo, Varela, 1996.
- BLOCK, S. S. *Desinfection, sterilization and preservation*. Philadelphia: Lea & Fibiger; 1991. cap. 9, p. 167-81.
- BOLTON, L. F. & FRANK, J. F. Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 350–353, 1999.
- BONNET, M. & MONTVILLE, T. J. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, v. 40, p. 237–242, 2005.
- CAMPBELL, J. E. & DIMMICK, R. L. Effect of 3% hydrogen peroxide on the viability of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 91, p. 925-929, 1966.

DAVIES, G. E.; FRANCIS, J. MARTIN, A.R.; ROSE, F. L. & SWAIN, G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, v. 9, p. 192-196, 1954.

DENTON, G. W. Chlorhexidine. In: Disinfection, sterilization and preservation. Block SS. ed. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 274-289, 1991.

INCZE, K. Dry Fermented Sausages. *Meat Science*, v. 49, n. 1, p. 169-177, 1998.

MAZZOLA, P. G.; MARTINS, A. M. S. & PENNA, T. C. V. Determination of decimal reduction (D-value) of chemical agents used in hospital disinfection. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 33-34, 2003.

MORELLI, A.M.F. Escherichia coli 0157:H7: ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes. 2008. 173 f. Tese (Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2008.

NASCIMENTO, M. S. Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras. 2002. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002.

STUMBO, C. R. Bacteriological considerations relating to process evaluation. *Food Technology*, v. 2, p. 115-132, 1948a.

STUMBO, C. R. A technique for studying resistance of bacterial spores to temperatures in the higher range. *Food Technology*, v. 2, p. 228-240, 1948b.

SUTTON, S. V. W.; WRZOCEK, T. & PROUD, D. W. Neutralization efficacy of Dey-Engley medium in testing of contact lens disinfecting solutions. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 70, p. 351-354, 1991.

THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; CHRISTIEANS, S. & VERNIZY-ROZAND, C. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 101, p. 189-200, 2005.

TURNERS, F. J. Hydrogen peroxide and other oxidant disinfectants, p. 240-250. In: S. S. BLOCK (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation, 3rd ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 1983.

VARABIOFF, Y. Incidence of *Listeria* in small goods. *Letters in Applied Microbiology*, v.14, p. 167-169, 1992.